

## Bibliographic Information

**Heterottelechelic polymers having biotin residue and enzymes modified with the polymers.**  
 Kataoka, Kazunori; Nagasaki, Sachio; Yamamoto, Chikai; Kwong, Glen S. (Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho (1999), 8 pp. CODEN: JKXXAF JP 11322916 A2 19991126 Heisei. Patent written in Japanese. Application: JP 98-142044 19980511. Priority: CAN 131:356145 AN 1999:753760 CAPLUS

## Patent Family Information

Patent No.	Kind	Date	Application No.	Date
JP 11322916	A2	19991126	JP 1998-142044	19980511

### Priority Application

JP 1998-142044 19980511

## Abstract

HCOA(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>B (A = alkyleneoxy; B = biotin moiety which may have linking group; n = 2-20,000), useful as diagnostic agents for biochem. substances, etc., are claimed. Also claimed are Enz-Y[CH<sub>2</sub>A(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>B]q (Enz = enzyme residue; Y = covalent bond formed via ε-amino group of lysine residue in the enzyme; q ≥ 1; A, B, n = same as above) useful as substitutes for enzyme-antibody conjugates in antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). The modified enzymes left in blood after dosing can be excreted from the body by administration of avidin. A THF soln. of 3,3-diethoxy-1-propanol was metalated with K naphthalene and then treated with ethylene oxide at 0° for 2 h. Anionic ring-opening polymn. was stopped by addn. of a DMSO soln. of N-succinimidyl-D-biotin to give polyethylene oxide having acetal group and biotin residue at each end. The heterottelechelic polymer was deacetalized and reacted with bovine carboxypeptidase A to give modified enzyme.

## Patent Classifications

**Main IPC:** C08G065-26. **Secondary IPC:** C12N011-08.

**Indexing --** Section 63-6 (Pharmaceuticals)  
 Section cross-reference(s): 38

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-322916

(43)公開日 平成11年(1999)11月26日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

C 08 G 65/26  
C 12 N 11/08

識別記号

F I

C 08 G 65/26  
C 12 N 11/08

E

審査請求 未請求 請求項の数3 FD (全 8 頁)

(21)出願番号

特願平10-142044

(22)出願日

平成10年(1998)5月11日

(71)出願人 593064629

片岡 一則

千葉県柏市大室1083-4

(72)発明者 片岡 一則

千葉県柏市大室1083-4 柏ビレッジ141

-9

(72)発明者 長崎 幸夫

茨城県北相馬郡守谷町けやき台3-5-17

(72)発明者 山本 誠

千葉県野田市花井209-10 バレノーブル

野田花井302号

(74)代理人 弁理士 小田島 平吉 (外2名)

最終頁に続く

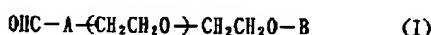
(54)【発明の名称】 ピオチン残基を片末端に有するヘテロテレケリックポリマー

(57)【要約】

【課題】 ピオチンを片末端に有するヘテロテレケリックポリマーの提供。

【解決手段】 一般式 (I)

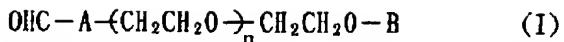
【化1】



式中、Aはアルキレンオキシ基であり、Bはピオチン残基を含有する基であり、nは2~20, 000の整数であるヘテロテレケリックポリマー、並びに式 (I) のα-末端アルデヒド基を用いて式 (I) のポリマーを酵素に共有結合させた修飾酵素。

【特許請求の範囲】

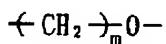
【請求項 1】 一般式 (I)



(式中、Aは、アルキレンオキシ基であり、Bは連結基を介することができるビオチン残基であり、そしてnは2~20, 000の整数である)で示されるヘテロテレケリックポリマー。

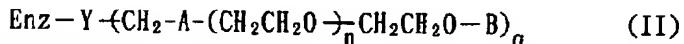
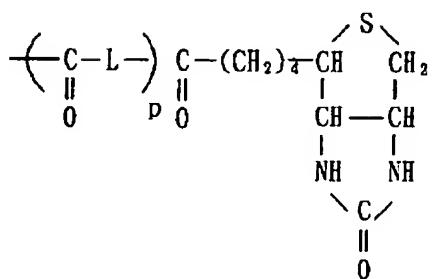
【請求項 2】 Aが、式

【化2】



(ここで、mは2~6で示されるアルキレンオキシ基であり、そしてBが、式

【化3】



(式中、Enzは、酵素の残基を表わし、Yは酵素中のリジン残基のε位のアミノ基を介して形成される少なくとも1個の共有結合であり、qは少なくとも1以上であり、かつ最大、酵素残基中に含まれるリジン残基の数であり、そしてA、B及びnは一般式 (I) について定義したとおりである)で表わされる修飾酵素。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヘテロテレケリックポリマー、具体的には片末端(α-末端)にアルデヒド基を有し、そしてもう一方の末端(ω-末端)にビオチン残基を有するヘテロテレケリックポリオキシエチレン、ならびにそれらと酵素のコンジュゲートである修飾酵素に関する。

【0002】

【発明の背景】酵素-抗体のコンジュゲートを生体内に投与し、かかるコンジュゲートを標的とする抗原部位に集積させ、一方、用いた酵素により活性化されるプロドラッグを投与し、抗原部位でプロドラッグを活性型のドラッグとして、標的部位で選択的に薬効を生じさせる、薬物療法が提案されている。かような薬物療法は、所謂、抗体指示性酵素プロドラッグ療法(antibody-directed enzyme prodrug therapy) (以下、ADEPTともいう)と称されており、毒性の高い薬物を毒性の低

【化1】

(式中、pは0または1であり、そしてLはC<sub>2</sub>~<sub>6</sub>アルキレンアミノ基、C<sub>2</sub>~<sub>6</sub>アルキレンオキシ基、または-CH(NH<sub>2</sub>)(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH-基である)で表わされる基である、請求項1記載のヘテロテレケリックポリマー。

【請求項 3】 一般式 (II)

【化4】

いプロドラッグとして全身的に投与するが、予め標的部位に集積せしめた酵素活性を利用して、該標的部位において、本来的な薬物の薬効を選択的に発揮させようとする、極めて興味深い療法である。

【0003】しかしながら、ADEPTを実施する上で、(a) 酵素-抗体コンジュゲートの作成には、極めて精緻な技術が必要であり、かつ相当な経費を要する、(b) 酵素-抗体コンジュゲート自体が免疫原性(または抗原性)を示すことにより、使用薬物に由来するもの以外の新たな副作用を惹起する可能性がある、(c) 酵素を結合させた抗体が立体障害等により、標的部位に充分集積せず、かなりの量が血流中などの標的部位以外に存在し、結果として、使用薬物による全身的な副作用が生じる可能性がある、などの問題点がある。

【0004】本発明者らは、かような問題点を解決するには、(i) 簡易な酵素キャリアの調製、(ii) 抗原性の低減、(iii) 特定の標的部位、例えば腫瘍部位への酵素の集積性を向上させる、手段の開発を目指してきた。

【0005】上記手段の開発を行うに際し、本発明者らは、酵素をポリエチレングリコール(またはポリオキシエチレン)で修飾すると、酵素の抗原性を低下せしめる可能性があることに着目した(例えば、稻田、「統タンパク質ハイブリッド」共立出版、p. 2~4参照)。ま

た、一般的に、腫瘍細胞の細胞膜は、通常細胞のそれに比べて、物質の透過性が増し、ポリマーの取り込み、細胞内滞留が長くなることも知られている（前田ら、例えば、Bioconju. Chem., 3, (1992) 128~139参照）。

【0006】他方、本発明者らの一部は、多機能性の生体親和性のポリマーとして、主鎖中にポリオキシエチレンセグメントを有し、分子の両末端に異種官能基を有するヘテロテレケリックポリマーの開発を行ってきた（例えば、国際公開第97/6202号等参照）。

【0007】

【発明の構成】本発明者らは、かようなヘテロテレケリックポリマーの片末端官能基を介して、生体内の標的部位以外（例えば、血流中）に存在するポリマーを選択的に除去しうるように修飾し、そしてもう一つの末端の官能基を介して酵素を共有結合せしめた酵素-合成ポリマーコンジュゲートは、生体内に投与後、標的部位へ集積し、また、血流中に存在する該コンジュゲートは、選択的に除去しうるように修飾した官能基を利用して生体外

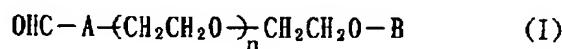
へ排泄除去しうるものと推察した。

【0008】以上の推察に基づき、ポリエチレングリコール（以下、PEGともいう）セグメントの片末端（ $\alpha$ -末端）に酵素（タンパク質）と容易に共有結合を形成しうるアルデヒド基を有し、もう一方の末端にビオチン残基を有するポリマーは、上記酵素-抗体コンジュゲートに随伴する問題点を有意に解消しうる、酵素-PEGコンジュゲートを容易に提供できることを見い出した。酵素-PEG-ビオチン残基からなるコンジュゲートが血流中に存在する場合、別にアビシンを投与すると血流中で前記コンジュゲートのビオチンとアビシンとの複合体を形成し、容易に生体外へ排泄させるであろう。また、アルデヒド基-PEG-ビオチン残基からなるヘテロテレケリックポリマーは、生体成分の診断用ツール等としても、有用であろう。

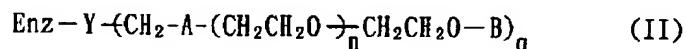
【0009】したがって、本発明によれば、一般式  
(I)

—[0-0-1-0]-

【化5】



【0011】（式中、Aは、アルキレンオキシ基であり、Bは連結基を介することができるビオチン残基であり、そしてnは2~20, 000、好ましくは50~20,000の整数である）で示されるヘテロテレケリックポリマーが提供される。



【0014】（式中、Enzは、酵素の残基を表わし、Yは酵素中のリジン残基のε位のアミノ基を介して形成される少なくとも1個の共有結合であり、qは少なくとも1以上であり、かつ最大、酵素残基中に含まれるリジン残基の数であり、そしてA、B及びnは一般式（I）について定義したとおりである）で表わされる修飾酵素も提供される。

【0015】これらの一般式（I）及び一般式（II）で示されるヘテロテレケリックポリマーは、上述のとおり、医療分野で有用である。

【0016】

【発明の具体的な態様】本明細書にいう、ヘテロテレケリック（hetero-telechelic）の語は、ポリマーの両分子末端に異種の官能基が存在していることを意味する。したがって、本発明に従う、一般式（I）及び（II）に示されるいずれのポリマーまたは修飾酵素も、ヘテロテレケリックポリマーの範疇に入る。

【0017】一般式（I）のポリマーにおける、式

【0023】である。 $\text{CH}_2\text{O}$ 一般式 $(\text{CH}_2)_n\text{O}$ におけるBの $\text{CH}_2\text{O}$ 如何なる連結基を有してもいいで $\text{CH}_2\text{O}$ 好ましくは、式定義である、連結基を介することのできるビオチン残基とは、ビオチン-アビシンの複合体を形成しうる限り、

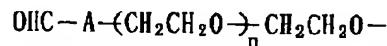
【0012】また、かかるポリマーと酵素とのコンジュゲートであって、具体的には、一般式（II）

【0013】

【化6】

【0018】

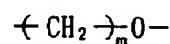
【化7】



【0019】で表される部位は、例えば、本発明者らの提供した国際公開第97/6202号に記載のブロックポリマーを製造するため、前駆体たるリビングPEGの製造方法に準じて製造することができるポリマーである（該国際公開の記載事項は、ここに引用することにより、本明細書の内容となる）。具体的には、A、式

【0020】

【化8】



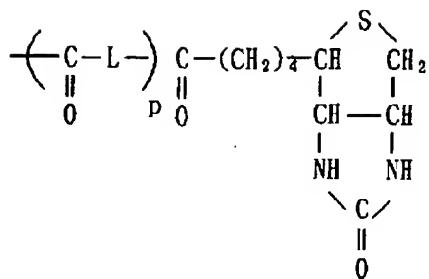
【0021】（ここで、mは2~6の正数である）で表わされる、したがって、Aの具体的な基としては、

【0022】

【化9】

【0024】

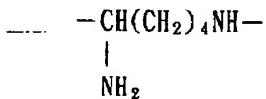
【化10】



【0025】で表わされ、上式中のpは0 (B基は、連結基を有さないビオチン残基に相当する)、或いは1 (連結基を有する場合に相当する) であって、pが1の場合のLは、C<sub>2</sub>～<sub>6</sub>アルキレンアミノ基、C<sub>2</sub>～<sub>6</sub>アルキレンオキシ基または

【0026】

【化11】



【0027】(先導するカルボニル基と一体となって、B基がビオチンに由来する残基に相当する)の基である。pが1であり、LがC<sub>2</sub>～<sub>6</sub>アルキレンアミノ及びC<sub>2</sub>～<sub>6</sub>アルキレンオキシを表わす、B基は、ビオチンと対応するラクタム及びラクトンの反応により誘導できる化合物に由来する。

【0028】かような一般式(I)で示されるヘテロテレケリックポリマーは、通常、まず最初に、式

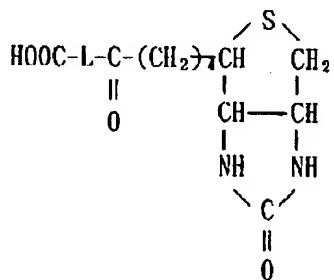
【0029】

【化12】

【0030】のアルカリ性基<sup>1</sup>、例えばアセタール化等により保護した化合物を、リビング重合触媒とともに重合開始剤として用い、エチレオキシドをアニオン重合させるそれ自体既知の重合法により、リビングポリマーを製造する。次いで、この反応液中に、例えば式

【0031】

【化13】



【0032】(式中、Lは上記定義のとおりである)で示されるビオチン誘導体、また、必要によりそれらの活

性エステル、活性イミド、を加えて、上記重合反応を停止させることにより、α-末端のアルデヒド基が保護された一般式(I)のポリマーを製造する。なお、この停止反応は、典型的には、室温下で、50時間まで反応液を攪拌することにより行うことができる。こうして得られたα-末端のアルデヒド基が保護されたポリマーの保護基(通常、アセタール基)は、加水分解反応に供することにより、一般式(I)のポリマーへ転化することができる。

【0033】本発明では、上記式(I)のポリマーのα-末端アルデヒド基を用いて、酵素(具体的には酵素中のリジン残基のε位のアミノ基とのシップ塩基の形成を通して)に結合させ、さらにシップ塩基をアミノ基に還元することにより、一般式(II)で示される修飾酵素を提供しうる。

【0034】したがって、一般式(II)におけるE<sub>n</sub>z-は、酵素中の1個以上のリジン残基のε位アミノ基に由来する結合手を有する酵素残基であり、Yは前記ε位のアミノ基と一般式(I)のα-末端アルデヒド基とにより形成される共有結合を表わす。また、qは、少なくとも1の整数を表わし、また酵素活性に悪影響を及ぼさない限り、最大、使用される酵素分子中に存在するリジン残基の数までありうるが、通常、1～10個程度であることが好ましい。酵素は、本発明の目的に沿う限り、複数のサブユニットからなるものであってもよい。酵素としては、通常、薬物のエステル化、アミド化、イミド化、リン酸化等によって、薬物本来の活性(毒性も包含する)が低下したプロドラッグを、本来の薬物に変換しうる作用を有するものが意図されているが、それらに限定されない。なお、上記のような変換活性を有する酵素はエステラーゼ、アミダーゼ、ホスファターゼと称されている既知の如何なる酵素であってもよい。またこれらの酵素の起源も、動物、植物または微生物のいずれに属するものであってもよい。

【0035】こうして、提供される一般式(II)で示される修飾酵素は、実質的に未修飾酵素の有する酵素活性をほとんど低減することなく保持している。したがって、これらの修飾酵素は、ビオチン残基の存在が悪影響を及ぼさない限り、未修飾酵素の使用可能な条件を、場合によって拡張する利点もある。

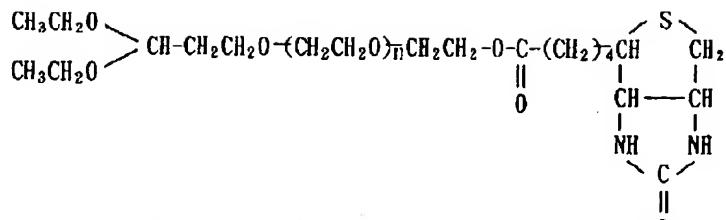
【0036】

【実施例】以下、具体例を挙げて、本発明をさらに詳細に説明するが、これらの例は、あくまで例示にすぎないことを、理解されたい。

【0037】実施例1：アセタール-PEO-ビオチンの製造

【0038】

【化14】



【0039】アルゴン下、受器中、室温において、開始剤3、3-ジエトキシ-1-プロパノール0.5mmol (0.08ml) を溶媒THF 7.6mlにマイクロシリジで加え、K-ナフタレン0.5mmol

(0.286 mol/l-THF溶液、1.75 ml)を加えてメタル化を施した後、エチレンオキシド 2.0 mlを加えて水冷下で2日間搅拌し、アニオン開環重合を行った。この後、停止剤としてN-スクシンイミジルーダービオチンのDMSO溶液(0.065 mol/l)を2倍モル量(15.4 ml)加えて2日間停止反応を行った。この後クロロホルム抽出、エーテル再沈、吸引濾過、減圧乾燥、ベンゼン凍結乾燥により精製を行った。この生成物の収率は88.0%であった。

【0040】TOF-MS(飛行時間型質量分析計)による測定により、このポリマーは一峰性であり、その分子量は約2600であった。

【0041】また、これらのピークの測定値と計算値を比較した結果、このポリマーはポリエチレンオキシドを主鎖に有し、 $\alpha$ -末端にアセタール基、 $\omega$ -末端にビオチンを有するヘテロテレケリックポリマーであることが確認された。

【0042】さらに、得られたポリマーのDMSO中でのプロトン核磁気共鳴スペクトルより、このポリマーはポリエチレンオキシドを主鎖に有し、 $\alpha$ -末端にアセタール基、 $\omega$ -末端にビオチンを有するヘテロテレケックポリマーであることが確認された（図1参照）。

### 【0043】実施例2: OCH-PEO-ビオチンの製造(脱アセタール化)

受器中において、アセタール-PEO-ビオチンポリマー-0.2 g を酢酸4 ml + 水0.4 ml の溶液に溶かし、恒温槽(20°C)中において5時間、アセタール基の脱離反応(脱保護)を施した。この後クロロホルム抽出、エーテル再沈、吸引濾過、減圧乾燥、ベンゼン凍結乾燥により精製を行った。この生成物の収率は79.6%であった。

### 【0044】TOF-MS（飛行時間型質量分析計）に

よる測定により、このポリマーは一峰性であり、その分子量は2500であった。またピークの測定値と計算値を比較した結果、このポリマーはポリエチレンオキシドを主鎖に有し、 $\alpha$ -末端にアルデヒド基、 $\omega$ -末端にビオチンを有するヘテロテレケリックポリマーであることが確認された。

【0045】得られたポリマーのDMSO中でのプロトン核磁気共鳴スペクトルより、このポリマーはポリエチレンオキシドを主鎖に有し、 $\alpha$ -末端にアルデヒド基、 $\omega$ -末端にビオチンを有するヘテロテレケリックポリマーであることが確認された。

### 実施例3：酵素-PEO-ビオチンの製造

反応容器中において、pH 7.2に調製したHEPES緩衝溶液2ml(0.1M)にウシのカルボキシペプチダーゼAのトルエン溶液0.527ml(含タンパク質10mg)およびCHO-PEO-ビオチンポリマー-26.1mgを加えて恒温槽中(20°C)で3時間攪拌した。その後この混合溶液に還元剤NaCNBH3 2.1mgを加え、2日間還元を行った。純水に対する透析(分画分子量12,000~14,000、2、4、8、24時間後に水交換)を2日間行うことで精製を行った。

【0046】この反応溶液に対してTOF-MS(飛行時間型質量分析計)による測定を行ったところ、ポリマー修飾前のカルボキシペプチダーゼAに由来するピークに対して、より高質量において、カルボキシペプチダーゼAとCHO-PEO-ビオチンが結合したものと思われるピークを確認した(図2、図3)。

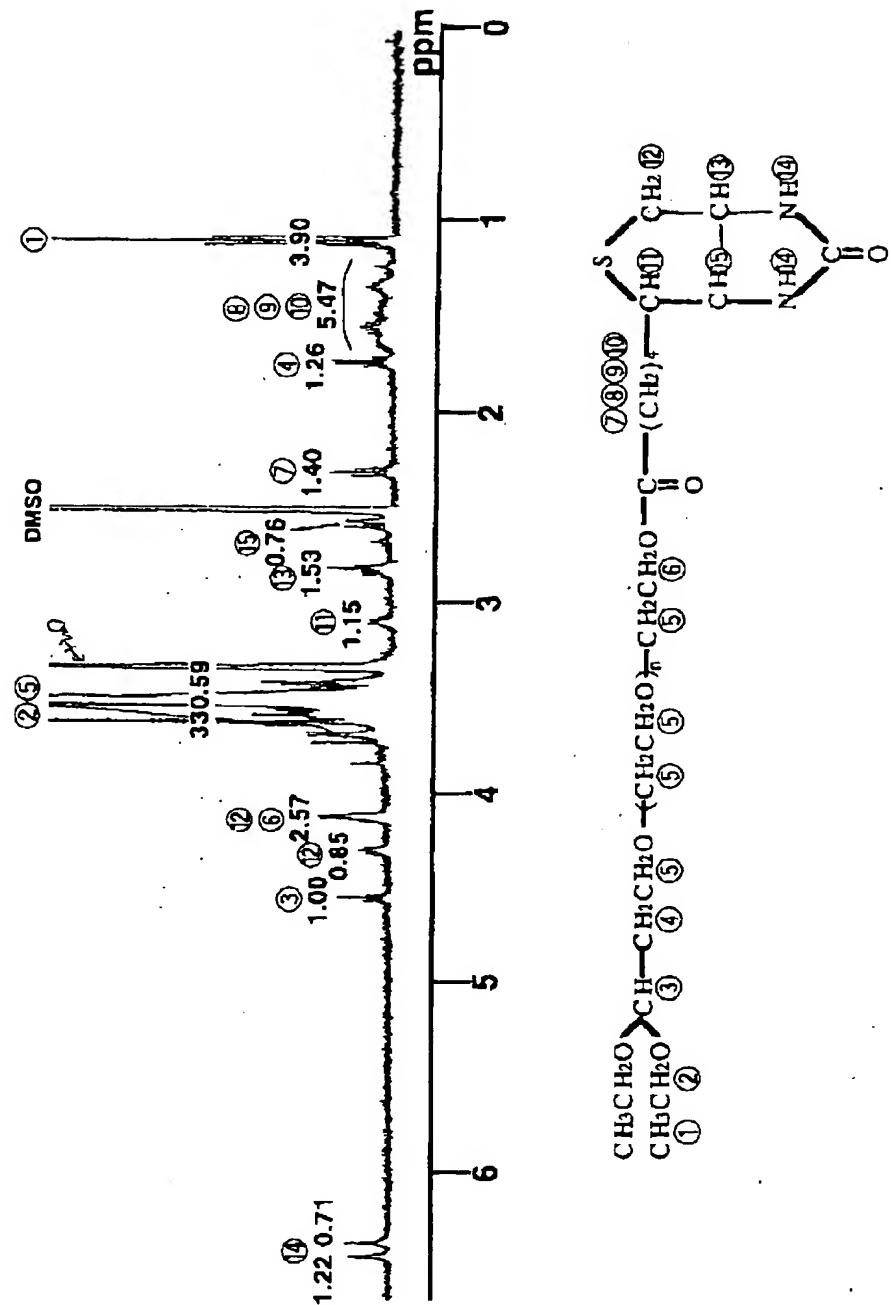
## 【画面の簡単な説明】

【図1】図1は実施例1で得られた、アセタールーEP-O-アビシンのプロトン核磁気共鳴スペクトラムである

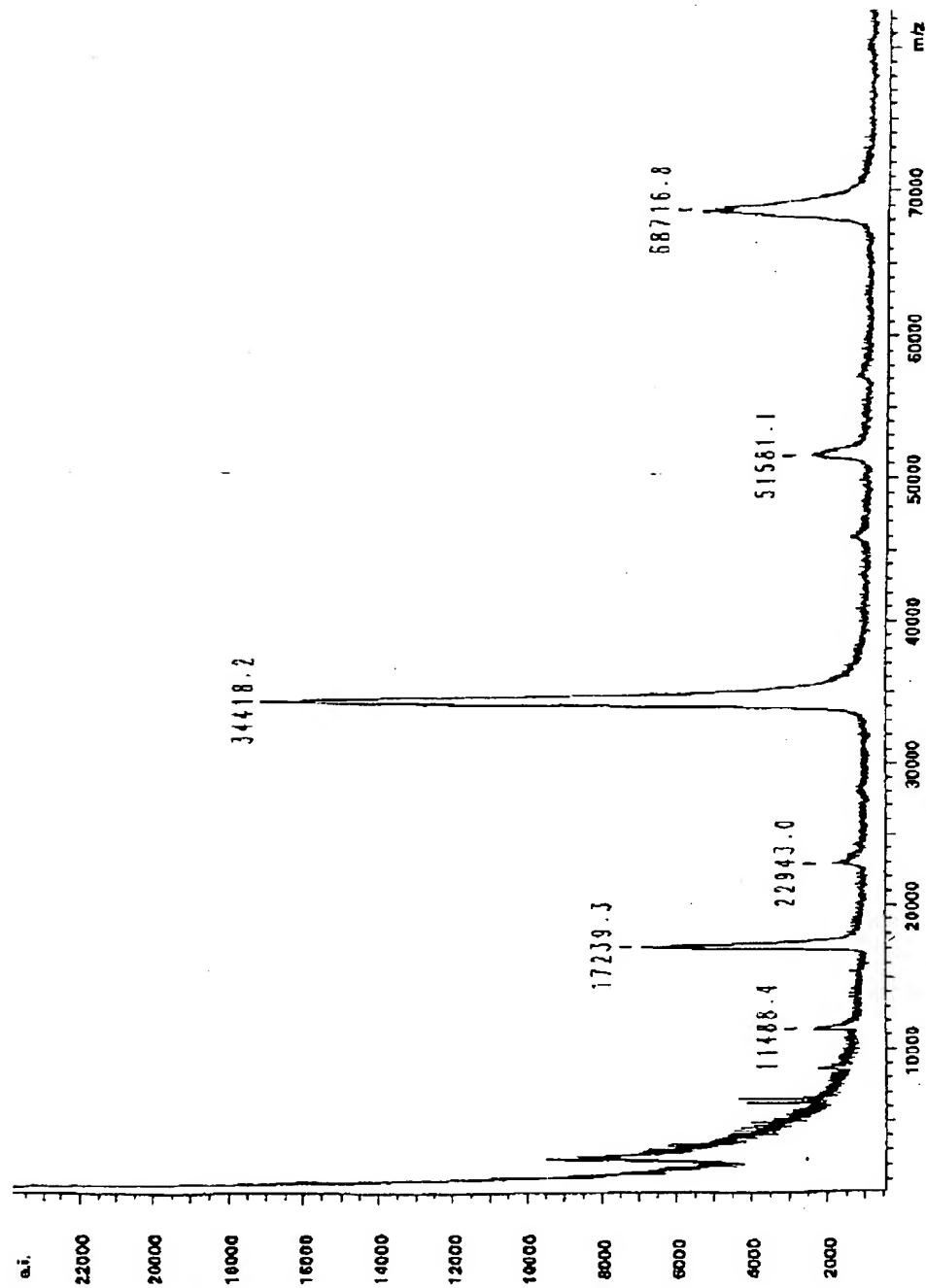
【図2】図2はカルボキシペチダーゼAのTOF-MSによる測定結果である。

【図3】図3は実施例3で得られた酵素-PEO-ビオチンのTOF-MSによる測定結果である。

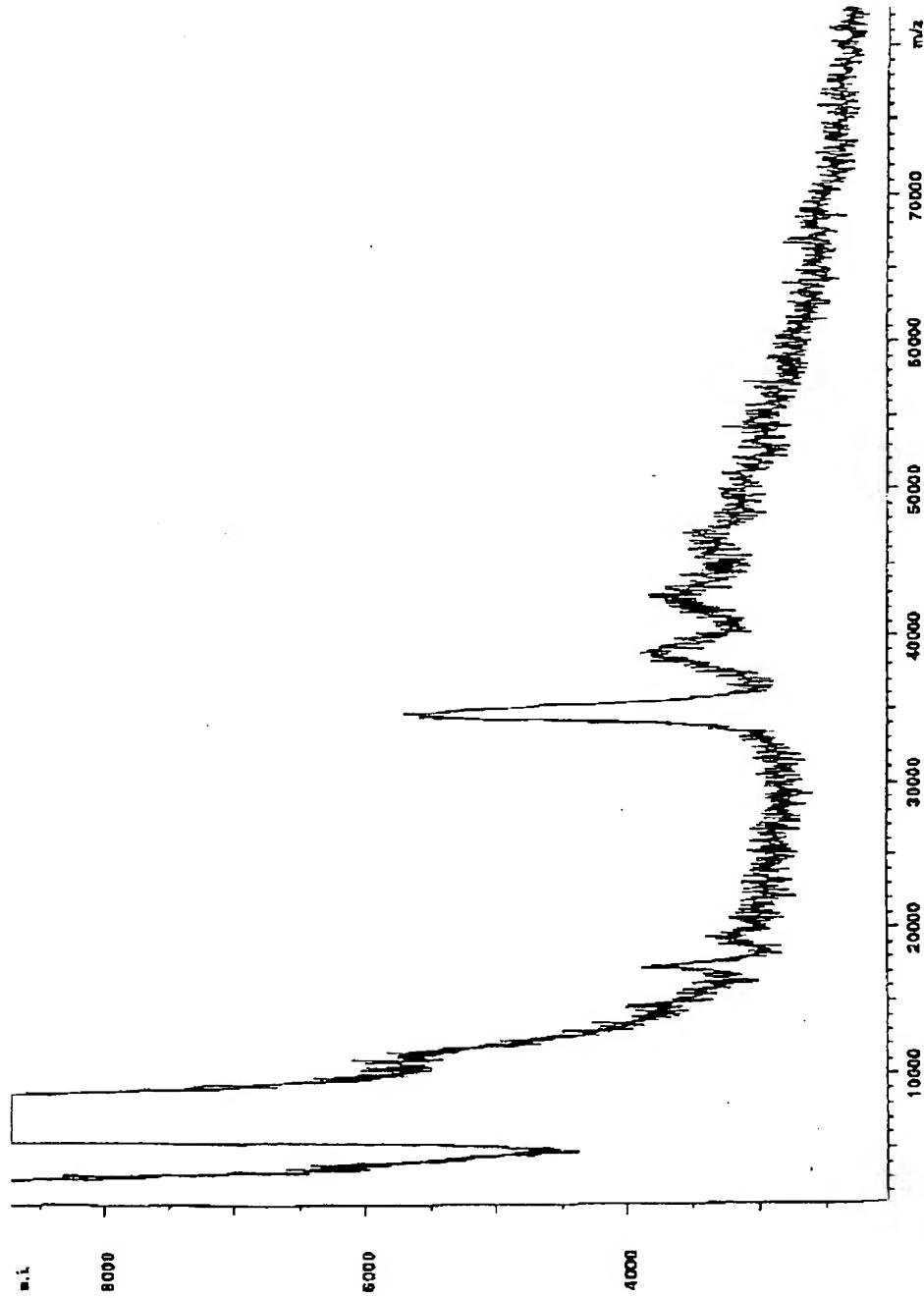
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 グレン・エス・クウォン  
アメリカ合衆国ウイスコンシン州53719マ  
デイソン・テインバーレイクトレイルナン  
バー310 7409